

УДК 57.084.1

DOI: 10.24884/1682-6655-2024-23-3-64-69

Ю. А. ТАМИНКИНА<sup>1</sup>, Н. Н. ПАВЛИЧЕНКО<sup>1</sup>,  
Е. Г. ГИЛЕРОВИЧ<sup>2</sup>, О. В. КИРИК<sup>2</sup>, Д. Э. КОРЖЕВСКИЙ<sup>2</sup>

## Опыт использования интракраниального введения эндотелина-1 для индукции ишемического повреждения головного мозга у крыс при оценке эффективности клеточной терапии

<sup>1</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия  
192148, Россия, Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия  
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12  
E-mail: taminkina.yulia@gmail.com

Статья поступила в редакцию 19.11.23 г.; принята к печати 12.02.24 г.

### Резюме

**Введение.** Ишемический инсульт занимает одно из первых мест среди причин инвалидизации и смертности населения. Одним из перспективных новых терапевтических методов является клеточная терапия. Для изучения клеточной терапии в лабораторных условиях важно выбрать подходящую экспериментальную модель инсульта. Экспериментальная модель с применением эндотелина-1 позволяет получить повреждение в корковых и подкорковых структурах мозга и при этом обладает малой травматичностью и относительной простотой в исполнении. **Цель** – оценить пригодность модели ишемического инсульта, воспроизведенной с помощью эндотелина-1, для анализа влияния клеточной терапии на восстановительные процессы. **Материалы и методы.** Самцы крыс линии Вистар-Киото были распределены по группам: ложная операция (n=4), контроль (n=4), клеточный контроль (n=9), клеточная терапия (n=8). Для оценки повреждения использовали методы морфометрии и иммуногистохимии с антителами к NeuN, GFAP, нестину и виментину. **Результаты.** Установлено, что данная модель вызывает ишемическое повреждение в области, близкой к месту инъекции, с характерными клеточными реакциями. При определении объема повреждения обнаружена выраженная внутригрупповая вариабельность, что не позволило подтвердить ожидаемый эффект клеточной терапии. **Заключение.** Эндотелиновая модель ишемии головного мозга пригодна для изучения клеточных реакций, развивающихся после ишемического инсульта, однако значительная вариабельность объема повреждения не позволяет ее рекомендовать для количественной оценки эффектов клеточной терапии.

**Ключевые слова:** инсульт, эндотелин-1, ишемическое повреждение, клеточная терапия

**Для цитирования:** Таминкина Ю. А., Павличенко Н. Н., Гилерович Е. Г., Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Опыт использования интракраниального введения эндотелина-1 для индукции ишемического повреждения головного мозга у крыс при оценке эффективности клеточной терапии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2024;23(3):64–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2024-23-3-64-69.

Yu. A. TAMINKINA<sup>1</sup>, N. N. PAVLICHENKO<sup>1</sup>,  
E. G. GILEROVICH<sup>2</sup>, O. V. KIRIK<sup>2</sup>, D. E. KORZHEVSKY<sup>2</sup>

## Experience of using intracranial introduction of endothelin-1 for inducing ischemic brain damage in rats to evaluate cell therapy efficacy

<sup>1</sup> Trans-Tekhnologii, Saint Petersburg, Russia  
40, Zheleznodorozhniy ave., Saint Petersburg, Russia, 192148

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia  
12, Akademika Pavlova str., Saint Petersburg, Russia, 197022  
E-mail: taminkina.yulia@gmail.com

Received 19.11.23; accepted 12.02.24

### Summary

**Introduction.** Ischemic stroke is one of the leading cause of disability and death. One of the promising therapeutic methods is cell therapy. The choice of an appropriate experimental stroke model is of great importance for studying the restorative effect of cell therapy in the laboratory. An experimental model using endothelin-1 allows to induce damage in the cortical and subcortical brain structures, while being relatively easy to perform and less traumatic. **Aim.** To assess the effectiveness of an

ischemic stroke model reproduced using endothelin-1 to analyze the results of general cellular therapy on recovery processes. *Materials and Methods.* Male Wistar-Kyoto rats were divided into groups: sham operation (n=4), ischemia control (n=4), cell control (n=9), cell therapy (n=8). Damage was assessed by using morphometry and immunohistochemistry with antibodies against NeuN, GFAP, nestin, and vimentin. *Results.* It has been established that this model causes ischemic damage in the area close to the injection site with characteristic cellular reactions. Assessing the size of the damage showed a large within-group variability, which did not allow us to confirm the expected effect of the cell therapy. *Conclusion.* The endothelin model of cerebral ischemia is suitable for studying the cellular reactions that develop after ischemic stroke, but the significant variability in the volume of damage does not allow it to be recommended for quantitative assessment of the effects of cell therapy.

**Keywords:** stroke, endothelin-1, ischemic injury, cell therapy

**For citation:** Taminkina Yu. A., Pavlichenko N. N., Gilerovich E. G., Kirik O. V., Korzhevsky D. E. Experience of using intracranial introduction of endothelin-1 for inducing ischemic brain damage in rats to evaluate cell therapy efficacy. *Regional hemodynamics and microcirculation.* 2024;23(3):64–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2024-23-3-64-69.

## Введение

Наиболее распространенной причиной нарушений функций головного мозга является ишемия [1]. На сегодняшний день в литературе описано множество методов для индукции ишемического повреждения, с помощью которых можно воспроизводить различные клинические случаи [2–5]. Однако подбор адекватной модели инсульта является сложной задачей. Особую важность выбор модели приобретает, если планируется изучение действия нового терапевтического агента или способа лечения, поскольку требуется получить ишемическое повреждение нервной ткани определенной степени тяжести в заданной области мозга.

Одним из перспективных подходов к воспроизведению ишемического повреждения мозга может быть применение эндотелина-1 в качестве сосудосуживающего средства, которое обеспечивает транзиторную ишемию в областях мозга, близких к месту инъекции. Преимущество метода перед наиболее распространенной моделью окклюзии средней мозговой артерии (СМА) [6–9] заключается в том, что вещество проникает непосредственно в ткань мозга в заданной точке, это позволяет не учитывать индивидуальные особенности ветвления СМА, которые могут иметь место даже у линейных крыс [2]. С помощью данного метода можно стандартизовать локализацию и объем ишемического повреждения, варьируя дозу и количество точек введения эндотелина-1 по стереотаксическим координатам [10]. Данная модель экспериментального инсульта должна характеризоваться малой травматичностью, хорошими показателями выживания животных в эксперименте и возможностью моделирования повреждения практически в любых корковых и подкорковых структурах мозга [3, 11–13]. Именно поэтому она может быть предпочтительной для исследования новых методов лечения ишемического повреждения, например клеточной терапии [14, 15].

**Цель** нашей работы состояла в том, чтобы проверить пригодность модели ишемического инсульта, воспроизведенной с помощью эндотелина-1, для анализа влияния клеточной терапии на восстановительные процессы.

## Материалы и методы исследования

Исследовали головной мозг крыс-самцов линии Вистар-Киото (250–300 г, 3–4 месяца, *Charles River Laboratories, EastLothian, UK*). Научная работа про-

водилась на базе лаборатории *Institute of Neuroscience (Newcastle University, UK)*, лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ ИЭМ (Санкт-Петербург, Россия) и научного отдела ООО «Транс-Технологии» (Санкт-Петербург, Россия).

**Моделирование ишемического инсульта головного мозга крысы.** Для проведения экспериментального инсульта использовали интракраниальное введение в мозг крысы эндотелина-1 (endothelin-1 (ET-1), Sigma E7764). Протокол экспериментов одобрен Локальным этическим комитетом при ФГБНУ ИЭМ (протокол № 3/19 от 25.04.2019 г.). Все манипуляции с животными проводили под общей анестезией в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS, Geneva, 1985 г.). Голова крысы фиксировалась в стереотаксической системе (DualM, RWD, Китай). Согласно выбранным координатам, делали отверстия в костях черепа с помощью бормашины. Через них шприцем Гамильтона в ткань мозга вводили эндотелин-1 в физиологическом растворе в концентрации 400 пМоль/мкл [11] в три участка последовательно: первичная моторная кора, первичная соматосенсорная кора и стриатум (на уровнях +0,2 мм, +2,2 мм и +0,7 мм относительно брегмы соответственно), по 2 инъекции объемом 1 мкл в каждую область [16]. Эффект введения контролировали при помощи лазерной доплерографии (лазерный флоуметр BLF21 (*Transonic, США*)), резкое снижение кровотока (на 90 %) в месте введения считали показателем успешно проведенной манипуляции [11].

В группе «ложная операция» (ЛО, n=4) животным проводили все манипуляции по моделированию ишемического повреждения, но без введения эндотелина-1. В группе контроля животным после инъекции эндотелина-1 вводили в хвостовую вену 0,8 мл физиологического раствора (n=4), в группе клеточного контроля (n=9) и группе клеточной терапии (n=8) животным после инъекции эндотелина-1 вводили в хвостовую вену фибробласты дермы человека (ФБДч) и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) в физиологическом растворе соответственно [17–19].

**Культивирование ММСК и фибробластов дермы человека.** ММСК человека и ФБДч были предоставлены банком стволовых клеток ООО «Транс-

Технологии». После размораживания клетки наращивали по общепринятой методике [20]. ММСК культивировали в полной ростовой среде, содержащей  $\alpha$ MEM (Minimum essential medium, Alpha modification) (79 %), FBS (Fetal bovine serum) (20 %), раствор пенициллина и стрептомицина (1 %) (*HyClone*, Новая Зеландия) и bFGF (Basic fibroblast growth factor, *Sigma*, Германия) (0,01 %). ФБДч культивировали в полной ростовой среде, содержащей dMEM (Minimum essential medium, d modification) (88 %), FBS (10 %), L-glutamine (1 %), раствор пенициллина и стрептомицина (1 %) (*HyClone*, Новая Зеландия). Для внутривенных введений клетки в количестве  $2 \times 10^6$  ресуспендировали в 0,8 мл физиологического раствора.

**Иммунофенотипирование ММСК и фибробластов дермы человека.** Клетки фенотипировали на проточном цитофлуориметре Epics XL (*Beckman Coulter*, США). ММСК КМ человека характеризовали на наличие следующих маркеров: CD90 (PE-Cy5, R-Phycoerythrin-Цуанин 5), CD44 (FITC, Fluorescein isothiocyanate), CD105 (PE, R-Phycoerythrin) (*Beckman Coulter*, США) и CD73 (PE, Becton Dickinson Biosciences, США). Также анализировали клетки на отсутствие маркеров гемопоэтических клеток CD34 (PE), CD45 (FITC), CD11b (FITC), CD14 (PE) (*Beckman Coulter*, США). Для фенотипирования ФБДч использовали моноклональные антитела CD90 (PE-Cy5, *Beckman Coulter*, США). Жизнеспособность всех клеток определяли по отсутствию окраски 7AAD (7-Aminoactinomycin D, *Beckman Coulter*, США). Анализ данных проводили в программе Kaluza (*Beckman Coulter*, США).

**Гистологическое исследование.** На 15-е сутки после экспериментального инсульта [21] наркотизированным животным проводили интракардиальную перфузию 4 % раствором параформальдегида (PFA) на фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4). Затем аккуратно вскрывали черепную коробку, извлекали мозг и погружали его на одни сутки в свежий раствор PFA. Обезвоживание и заливку в парафин проводили по общепринятой методике. При помощи микротомы получали фронтальные срезы толщиной 10  $\mu$ m. Срезы монтировали на покрытые поли-L-лизинном предметные стекла. В качестве обзорной окраски использовали окрашивание толуидиновым синим по Нисслю.

**Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга.** Все постановки иммуногистохимических реакций проводили после стандартной процедуры депарафинирования, регидратации и высокотемпературного демаскирования в модифицированном цитратном буфере S1700 (*Dako*, Дания) с последующим блокированием эндогенной пероксидазы 3 % раствором перекиси водорода. Для иммуногистохимического выявления зрелых нейронов головного мозга использовали моноклональные мышиные антитела к ядерному белку нервных клеток NeuN (*Chemicon*, США). Для определения глиальной реакции использовали поликлональные кроличьи антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (ГФКБ) (RTU, *Agilent*, США); моноклональные мышиные антитела к виментину (*Agilent*, США);

моноклональные мышиные антитела к нестину (*BD Pharmingen*, США).

Для выявления первичных антител для световой микроскопии использовали набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (*Spring Bioscience*, США). Визуализацию реакции проводили с использованием диаминобензидинового хромогена (DAB+, *Agilent*, США). После проведения иммуноцитохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином.

Анализ препаратов и получение цифровых изображений проводили используя микроскоп Leica DM750 (*Leica*, Германия) и цифровую камеру ICC50 (*Leica*, Германия). Анализ результатов иммунофлуоресцентной реакции проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 800 (*Zeiss*, Германия) и программы Zen-2012 (*Zeiss*, Германия). Морфометрические измерения проводились в программе ImageJ (NIH).

**Расчет объема повреждения и статистическая обработка данных.** Оценку объема повреждения проводили на препаратах, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю, в программе Image Scope (*Leica Biosystems*, США). Для каждого препарата рассчитывали среднюю площадь повреждения. Полученные значения использовали в стандартной формуле для расчета объема повреждения при ручном подсчете:

$$V_{\text{повр}} = L \times (N-1) \times \text{СУММАС}_{\text{повр}},$$

где  $V_{\text{повр}}$  – объем поврежденной части мозга; L – расстояние между срезами, на которых проводили измерение площади повреждения; N – количество срезов, на которых подсчитывали площадь повреждения.

Статистическая обработка данных проведена в программе StatGraphics Centurion (*StatPoint Inc.*, США). Данные представлены в виде медианы (межквартильный размах – МКР). В случае соблюдения условий нормальности распределения и равенства дисперсий (оценивались при помощи критериев Шапиро–Уилка и Бартлетта) проводили дисперсионный анализ. Если условия применения дисперсионного анализа не соблюдались, использовали критерий Краскала–Уоллиса. При обнаружении статистически значимого отличия между группами, проводили апостериорное сравнение данных (после дисперсионного анализа – тест Тьюки, после теста Краскала–Уоллиса – критерий Манна–Уитни–Вилкоксона). Критическим уровнем значимости был принят  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

**Иммунофенотип ММСК и фибробластов дермы человека.** ММСК характеризовались экспрессией специфических маркеров CD90, CD44, CD105, CD73, количество таких клеток составляло более 95 % от всей популяции (рис. 1, а–з). При этом они были негативны по маркерам (менее 2 %), характерным для гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD11b, CD14 (рис. 1, д, е). Более 95 % клеток культуры фибробластов дермы человека были иммунопозитивными к CD90 (рис. 1, з).

**Характеристика гистологического материала.** У животных из группы ЛО в нервной ткани головного мозга отсутствовали очаговые изменения и при-

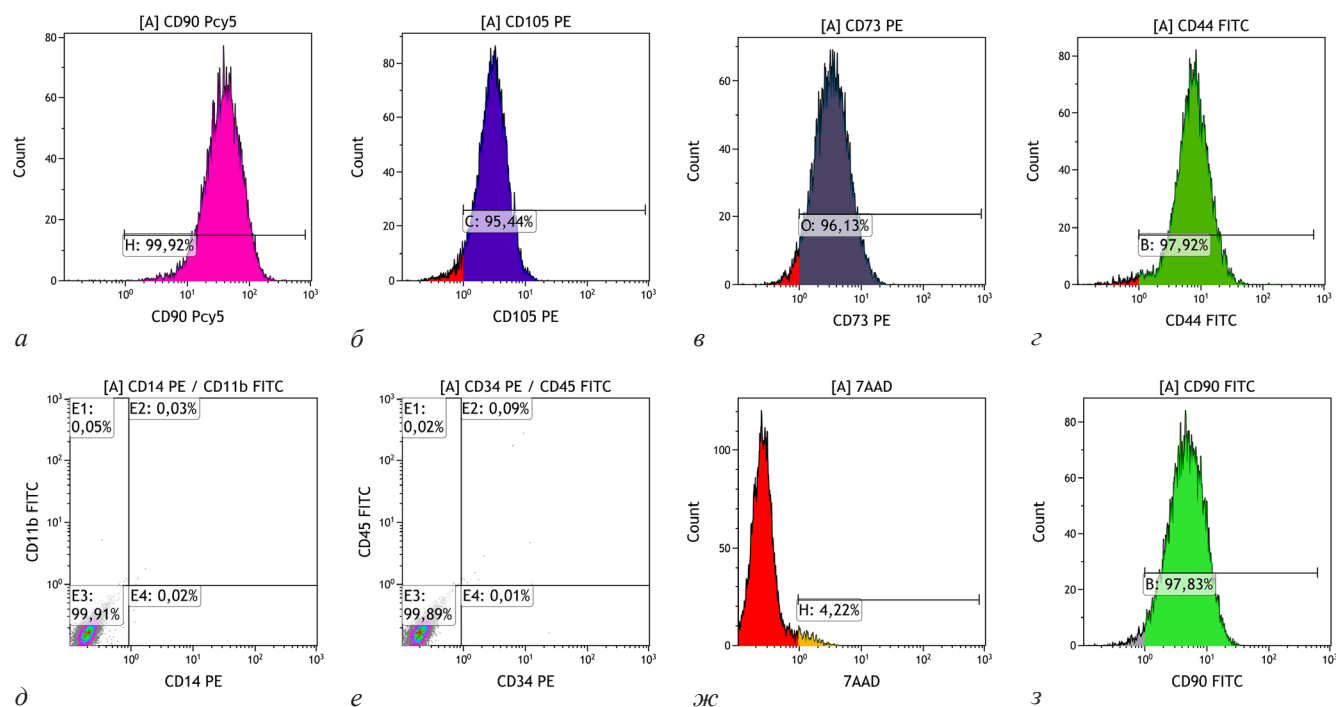


Рис. 1. Результат иммунофенотипирования клеток. Иммунофенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: а – количество CD90<sup>+</sup> клеток от всей популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток составляет 99,92 %; б – CD105<sup>+</sup> клеток – 95,44 %; в – CD73<sup>+</sup> клеток – 96,3 %; г – CD44<sup>+</sup> клеток – 97,92 %; д – CD14<sup>+</sup> клеток – 0,05 %, CD11b<sup>+</sup> клеток – 0,08 %; е – CD45<sup>+</sup> клеток – 0,11 %, CD34<sup>+</sup> клеток – 0,1 %; ж – 7AAD<sup>+</sup> клеток – 4,22 %. Иммунофенотип фибробластов дермы человека: з – количество CD90<sup>+</sup> клеток от всей популяции фибробластов дермы человека – 97,83 %

Fig. 1. Result of cell immunophenotyping. Immunophenotype multipotent mesenchymal stromal cells: а – the number of CD90<sup>+</sup> cells from the entire Immunophenotype multipotent mesenchymal stromal cells population is 99.92 %; б – CD105<sup>+</sup> cells – 95.44 %; в – CD73<sup>+</sup> cells – 96.3 %; г – CD44<sup>+</sup> cells – 97.92 %; д – CD14<sup>+</sup> cells – 0.05 %, CD11b<sup>+</sup> cells – 0.08 %; е – CD45<sup>+</sup> cells – 0.11 %, CD34<sup>+</sup> cells – 0.1 %; ж – 7AAD<sup>+</sup> cells – 4.22 %. Immunophenotype human dermal fibroblasts; з – the number of CD90<sup>+</sup> cells from the entire human dermal fibroblasts population is 97.83 %



Рис. 2. Сканированные изображения мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция против глиального фибриллярного кислого белка (1), виментина (2) и нестина (3). Масштабный отрезок равен 3 мм

Fig. 2. Rat brain scans. Immunohistochemistry reaction against glial fibrillary acidic protein (1), vimentin (2) and nestin (3). The scale line is 3 mm

знаки дегенерации нейронов. В зависимости от локализации очага ишемии и степени деструкции ткани различали два типа дефекта: небольшое повреждение (затрагивало неокортекс, преимущественно соматосенсорную и моторную области, иногда стриатум) и значительное повреждение (затрагивало большую часть неокортекса, наружную капсулу и хвостатое ядро). При значительном повреждении наблюдалась очаговая некротическая деструкция ткани, сопровождающаяся выраженной воспалительной реакцией.

Подсчет объема повреждения проводили во всех группах, кроме ЛО (n=21). Статистически значимой разницы в размере повреждения между группами не обнаружено (критерий Краскела–Уоллиса,  $H=2,6$ ,  $p=0,27$ ).

Размер инфаркта мозга существенно отличается у животных в пределах индивидуальных групп: ме-

диана (верхний и нижний квартили) в контрольной группе составляет 0,96 (0,00; 5,40), в группе с введением ФБДч – 3,60 (2,98; 762,3), в группе клеточной терапии – 0,13 (0,01; 8,13).

Мы обнаружили, что NeuN-позитивные нейроны в ядре инфаркта полностью отсутствуют. Оценку морфофункционального состояния астроглии проводили с помощью иммуногистохимической реакции на белки промежуточных филаментов ГФКБ, виментин и нестин. На препаратах ГФКБ-иммунопозитивные клетки были равномерно распределены по всей площади среза ткани мозга. Вблизи области повреждения наблюдалась более яркая реакция (рис. 2, 1). Виментин-иммунопозитивная реакция регистрировалась в эндотелии сосудов, эпендиме и в клетках, расположенных в виде широкой ленты по границе повреждения (рис. 2, 2), также в этой пограничной

области отмечали присутствие нестин-иммунопозитивных клеток (рис. 2, 3).

Проведенное исследование подтвердило, что порядок действий по воспроизведению экспериментального инсульта с введением эндотелина-1 достаточно прост и не требует специальных навыков в области хирургии. При этом такой подход занимает гораздо меньше времени и менее травматичен по сравнению с операцией по проведению прямой коагуляции СМА [22]. Стоит, конечно, принять во внимание, что для введения эндотелина-1 в ткань головного мозга необходимо нарушить целостность костей черепа. Однако такие действия по нашему наблюдению не влияют на дальнейшую жизнедеятельность животных, в отличие от экспериментального инсульта с прямой коагуляцией СМА, где может происходить повреждение жевательных мышц, что затрудняет самостоятельный прием пищи. В результате сложной и долгой операции (перманентная окклюзия СМА) увеличивается число летальных исходов. Таким образом, по уровню технической сложности модель с использованием эндотелина-1 является сравнительно простой.

При введении эндотелина-1 были получены инфаркты, затрагивающие кору и глубокие структуры головного мозга. По границе повреждения находится зона ишемической полутени, или пенумбра, в которой располагаются клетки, имеющие потенциальные возможности к восстановлению. В большинстве случаев терапия постинсультного состояния, включая клеточную терапию, направлена на поддержание жизнеспособности нейронов именно в этой области. В случае успешного лечения происходит восстановление пограничной к очагу инфаркта ткани и область дефекта уменьшается, в случае неудачного лечения – увеличивается. В нашем исследовании наблюдалась большая вариабельность размеров повреждения, что не позволило нам установить положительные эффекты от использования клеточной терапии. По литературным данным получение устойчивого результата после введения эндотелина-1 (значительное снижение кровотока в месте введения) возможно при проведении инфузии на расстоянии не более чем 0,5 мм от сосуда [11, 23]. Возможно, причиной плохой воспроизводимости модели является наличие индивидуальной изменчивости ветвления дистальных частей СМА, которая встречается даже у линейных животных [4]. Нельзя исключить и влияние партий эндотелина-1, используемых в эксперименте [23].

Другая возможная причина полученной вариабельности – разная чувствительность животных к введению эндотелина-1 [12, 23, 24]. Возможно, что для получения однородных по объему повреждений мозга при использовании эндотелина-1 критически важен объем мозга экспериментального животного.

Несмотря на то, что данная модель воспроизводится у крыс со значительной вариабельностью объема повреждения, полученный материал позволяет провести оценку клеточных реакций, возникающих в ответ на ишемический инсульт [14]. Это заключение подтверждается присутствием различных типов клеток нервной ткани, претерпевающих реактивные изменения в отдаленный постинсультный период

(15 суток). Используемая модель позволяет провести анализ интересующих областей с возможностью количественной оценки различных популяций клеток, что соответствует рекомендациям STAIR [25]. Вероятно, негативные моменты, связанные с вариабельностью размеров области инсульта при использовании эндотелина-1, отсутствуют в случае применения этого вазоконстриктора в остром эксперименте [26, 27].

### Заключение

В представленной работе показано, что модель с внутрикраниальным введением эндотелина-1 технически легко воспроизводима в сравнении с другими методами индукции фокальной ишемии головного мозга. Модель пригодна для изучения клеточных реакций, развивающихся после ишемического инсульта, но в связи со значительной вариабельностью объемов повреждений нервной ткани, не может рассматриваться в качестве модели выбора для оценки влияния клеточной терапии.

### Финансирование / Financing

Работа выполнена при финансировании из средств Госзадания ФГБНУ «ИЭМ» и ООО «Транс-Технологии». / The work was carried out with financing from the funds of the state contract of the Institute of Experimental Medicine and LLC «Trans-Technologies».

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare that they have no conflict of interest.

### Литература / References

1. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии / Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. – 2009. – Т. 147, № 2. – С. 255–256. [Korzhevskii DE, Kirik OV, Baisa AE, Vlasov TD. Simulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery. Bull Exp Biol Med. 2009;147(2):255-256. (in Russ.).]
2. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. NeuroRx. 2005;2(3):396-409. Doi: 10.1602/neurorx.2.3.396.
3. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3445-3454. Doi: 10.2147/DDDT.S56071.
4. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. Acta Neuropathol. 2017;133(2):245-261. Doi: 10.1007/s00401-017-1667-0.
5. Полякова Е.А., Дранишников Н.В., Власов Т.Д. Метод моделирования обратимой окклюзии средней мозговой артерии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 61–63. [Polyakova EA, Dranishnikov NV, Vlasov TD. Method of modeling reversible occlusion of the middle cerebral artery. Regional circulation and microcirculation. 2009;13(3):61-63. (in Russ.).]
6. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга : монография / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – М.: Медицина, 2001. – 327 с. [Gusev EI, Skvortsova VI. Cerebral ischemia: monograph. Moscow, 2001:327. (in Russ.).]
7. Macrae IM. Preclinical stroke research - advantages and disadvantages of the most common rodent models of fo-

- cal ischaemia. *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1062-1078. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.
8. Llovera G, Roth S, Plesnila N, Veltkamp R, Liesz A. Modeling stroke in mice: Permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. *J Vis Exp.* 2014;(89):e51729. Doi: 10.3791/51729.
9. Sokolowski JD, Soldozy S, Sharifi KA, Norat P, Kearns KN, Liu L, Williams AM, Yağmur K, Mastorakos P, Miller GW, Kalani MYS, Park MS, Kellogg RT, Tvrdik P. Preclinical models of middle cerebral artery occlusion: new imaging approaches to a classic technique. *Front Neurol.* 2023;14:1170675. Doi: 10.3389/fneur.2023.1170675.
10. Abeysinghe HCS, Roulston CL. A complete guide to using the endothelin-1 model of stroke in conscious rats for acute and long-term recovery studies. *Methods Mol Biol.* 2018;1717:115-133. Doi: 10.1007/978-1-4939-7526-6\_10.
11. Ansari S, Azari H, Caldwell KJ, Regenhart RW, Hedna VS, Waters MF, Hoh BL, Mecca AP. Endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in rat. 2013;(72):500014. Doi: 10.3791/50014.
12. Horie N, Maq A-L, Hamilton SA Shichinohe H, Bliss TM, Steinberg GK. Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. *J Neurosci Methods.* 2008;173(2):286-290. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.06.013.
13. Wang Y, Jin K, Greenberg DA. Neurogenesis associated with endothelin-induced cortical infarction in the mouse. *Brain Res.* 2007;1167:118-122. Doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.065.
14. Lowrance SA, Fink KD, Crane A, Matyas J, Dey ND, Matchynski JJ, Thibo T, Reinke T, Kippe J, Hoffman C, Sandstrom M, Rossignol J, Dunbar GL. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate cognitive deficits in an endothelin-1 rat model of stroke. *Restor Neurol Neurosci.* 2015;33(4):579-588. Doi: 10.3233/RNN-130329.
15. Ejma M, Madetko N, Brzecka A, Alster P, Budrewicz S, Koszewicz M, Misiuk-Hojło M, Tomilova IK, Somasundaram SG, Kirkland CE. The Role of Stem Cells in the Therapy of Stroke. *Curr. Neuropharmacol.* 2022;20(3):630-647. Doi: 10.2174/1570159X19666210806163352.
16. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th Edition. San Diego, Acad Press. 2013:472.
17. Russell WMS, Birch RL. The principles of humane experimental technique. London, Methuen & Co, 1959:238.
18. Zutphen BF, Valk JB. Education and training: a basis for the introduction of the Three Rs alternatives into animal research. *Altern Lab Anim.* 1995;23(1):123-127.
19. Yamaguchi S, Yoshida M, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Ishizaka S, Ogawa K, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Kawakami S, Nishida N, Matsuo T. Stem Cell Therapy for Acute/Subacute Ischemic Stroke with a Focus on Intraarterial Stem Cell Transplantation: From Basic Research to Clinical Trials. *Bioengineering (Basel).* 2022;10(1):33. Doi: 10.3390/bioengineering10010033.
20. Penfornis P, Pochampally R. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. *Methods Mol Biol.* 2011;698:11-21. Doi: 10.1007/978-1-60761-999-4\_2.
21. Колпакова М.Э., Фильченко И.А., Трайковский А. и др. Особенности поведения в восьмируковом лабиринте на фоне изменений активности микроглии полосатого тела после моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 92–96. [Kolpakova ME, Filchenko IA, Trajkovski A, Tsyba DL, Kirik OV, Han A, Leipert A, Korzhevskii DE, Vlasov TD. Rat's behaviour in eight-arms maze after modeling of focal transient cerebral ischemia with subsequent activation of striatal microglia. Regional blood circulation and microcirculation. 2018;17(2):92-96. (in Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-92-96.
22. Pavlichenko N, Sokolova I, Vijde S, Shvedova E, Alexandrov G, Krouglyakov P, Fedotova O, Gilerovich EG, Polyntsev DG, Otellin VA. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res.* 2008;1233:203-213. Doi: 10.1016/j.brainres.2008.06.123.
23. O'Neill MJ, Clemens JA. Rodent models of focal cerebral ischemia. *Curr Protoc Neurosci.* 2001; Chapter 9: Unit 9.6. Doi: 10.1002/0471142301.ns0906s12.
24. Teo L, Bourne JA. A reproducible and translatable model of focal ischemia in the visual cortex of infant and adult marmoset monkeys. *Brain Pathol.* 2014;24(5):459-474. Doi: 10.1111/bpa.12129.
25. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW et al.; STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009;40(6):2244-2250. Doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
26. Sugimoto K, Morais A, Sadeghian H, Qin T, Chung DY, Ashina M, Hougaard A, Ayata C. Intravascular endothelin-1 does not trigger or increase susceptibility to spreading depolarizations. *J Headache Pain.* 2020;21(1):127. Doi: 10.1186/s10194-020-01194-3.
27. Bazzigaluppi P, Mester J, Joo IL, Weisspapir I, Dorr A, Koletar MM, Beckett TL, Khosravani H, Carlen P, Stefanovic B. Frequency selective neuronal modulation triggers spreading depolarizations in the rat endothelin-1 model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021;41(10):2756-2768. Doi: 10.1177/0271678X211013656.

## Информация об авторах

**Таминкина Юлия Александровна** – научный сотрудник научно-исследовательского отдела ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: taminkina.yulia@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5256-9360.

**Павличенко Наталья Николаевна** – канд. биол. наук, руководитель группы научно-исследовательского отдела ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: pravlichenko@alkorbio.ru, ORCID: 0000-0002-4455-6743.

**Кирик Ольга Викторовна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: olga\_kirik@mail.ru, ORCID: 0000-0001-6113-394.

**Гилерович Елена Георгиевна** – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: andreura@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-8074-2041.

**Коржевский Дмитрий Эдуардович** – д-р мед. наук, профессор РАН, руководитель Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: DEK2@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-2456-8165.

## Authors information

**Taminkina Yulia A.** – Researcher, Research Department, Trans-Tekhnologii, Saint Petersburg, Russia, e-mail: taminkina.yulia@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5256-9360.

**Pavlichenko Natalya N.** – Candidate (Ph.D) of Biological Sciences, Head, Group, Research Department, Trans-Tekhnologii, Saint Petersburg, Russia, e-mail: taminkina.yulia@gmail.com, ORCID: 0000-0002-4455-6743.

**Kirik Olga V.** – Candidate (Ph.D) of Biological Sciences, Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia, e-mail: olga\_kirik@mail.ru, ORCID: 0000-0001-6113-394.

**Gilerovich Elena G.** – Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia, e-mail: andreura@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-8074-2041.

**Korzhevsky Dmitry E.** – Doctor of Medical Sciences, Member of the Russian Academy of Sciences, Head, Department of General and Particular Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia, e-mail: DEK2@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-2456-8165.